Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgM EIA	Mode d'emploi		Fabricant : **Reagena International Oy Ltd** **Takojantie 18, 70900 Toivala, FINLANDE** **www.reagena.fi, info@reagena.fi**	
REF 114202	Version 1.1 FRE			

Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgM EIA

Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgM EIA est une épreuve immunoenzymatique de détection des infections aiguës par les virus Dobrava et Hantaan dans le sérum humain. Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgM EIA est exclusivement destiné à l'usage professionnel.

Les virus Hantaan et Dobrava appartiennent au genre hantavirus et sont connus pour causer des fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FHSR). Le virus Hantaan est présent dans la plupart des pays asiatiques alors que le virus Dobrava se trouve en Europe centrale et orientale. Les virus Hantaan et Dobrava sont transmis aux humains par inhalation ou contact direct avec des escréments de rongeurs contaminés.

PRINCIPE DU TEST

Les anticorps IgM Hantaan et Dobrava présents dans l'échantillon sont capturés par les anticorps spécifiques de la chaîne µ sur la plaque de microtitration. Les anticorps IgM de l'hantavirus sont détectés par l'enyzme PR (peroxydase de raifort) couplés à la protéine recombinante de la nucléocapside du virus Hantaan. Le développement de la coloration est ensuite assuré par le substrat TMB. Le temps d'incubation total est de 2 heures et demie et le kit permet d'effectuer 40 analyses en double.

CONTENU DU KIT

1 cadre EIA
3x4 bâtonnets diagnostiques (8-barrettes de microtitration)
Tampon de concentré de lavage x 2
Tampon pour dilution
Contrôle, négatif
Contrôle, positif
Conjugué HRP
Substrat TMB
Solution d'arrêt
Mode d'emploi

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON INCLUS DANS LE KIT

Pipettes de précision et embouts de pipette, 5-100 µl
Pipette ou dispositif de lavage de la plaque 250 µl / microcupule
Tubes d'échantillonnage 1 - 5 ml
Une fiole de 0,5 ou 1 L
Ruban d'étanchéité EIA
Lecteur de microplaque EIA à longueur d'onde de 450 nm
Agitateur de plaque à microcupules

CONSERVATION

Conserver le kit entre +4 et +8°C. Le kit reste stable jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Voir le tableau page 2 pour les informations concernant la conservation et la stabilité du kit.

ÉCHANTILLONS

Il est conseillé d'utiliser des échantillons frais (plutôt que congelés). Les échantillons congelés peuvent entraîner des faux positifs lorsque les résultats sont agrégés. Si l'échantillon est agrégé ou de mauvaise qualité, centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 3000 x g avant de les utiliser.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

- Ne pas mélanger de composants issus de lots différents.
- Ne pas utiliser de bâtonnets diagnostiques si l'emballage en aluminium qui les contient est endommagé.
- Ne pas mélanger les échantillons à tester puisque différentes matrices pourraient entraîner une mauvaise reproductibilité.
- Toute infection bactérienne ou fongique des tampons ou réactifs pourra entraîner des résultats erronés. Jeter tout réactif qui aurait l'air trouble lorsque vous l'inspectez à la lumière.

AVERTISSEMENT

- Les contrôles comprennent du sérum humain testé et trouvé négatif en VIH, HTLV, hépatite B et C. Veuillez manipuler les contrôles comme des substances potentiellement infectantes.
- Jetez les contrôles, échantillons et matériels conformément aux réglementations locales et fédérales vous concernant.
- La solution d'arrêt Reagena EIA contient < 1% m/V d'acide sulfurique. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.
- Le substrat TMB Reagena EIA contient du 3,3,5,5-tétraméthylbenzidine < 0,05% w/w. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.

PROCÉDURE DE TEST

Lire attentivement le mode d'emploi avant de commencer les tests. Contacter le fabricant ou votre fournisseur en cas de questions supplémentaires concernant le produit. Effectuer les tests entre +15 et +25°C. Conserver le kit au réfrigérateur (entre +4 et 8 °C) pendant les périodes d'incubation.

1. Ouvrir le kit et vérifier qu'il contienne tous les composants figurant sur l'étiquette du couvercle.
2. Diluer les échantillons à 1:201 avec le tampon de dilution (c-à-d 5 µl d'échantillon + 1000 µl de tampon de dilution).
3. Diluer le tampon de concentré de lavage à 1:10 avec de l'eau désionisée (c-à-d 50 ml de tampon de concentré de lavage + 450 ml d'eau). Bien mélanger.
4. Dissoudre le contrôle positif et le contrôle négatif avec 1,3 ml de tampon de dilution et bien mélanger
5. Prendre le nombre requis de bâtonnets diagnostiques EIA de leur emballage en aluminium et les placer sur le cadre EIA. Si tous les bâtonnets ne sont pas utilisés, refermer immédiatement l'emballage en aluminium et conserver les bâtonnets restants entre +4 et +8°C.
6. Laver les microcupules EIA une fois avec le tampon de lavage (250 µl / cupule). Vider les microcupules et les humidifier avec le papier mouchoir.
7. Transférer en double les dilutions d'échantillons, de contrôles positif et négatif sur la plaque (100 µl / microcupule).
8. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
9. Diluer le conjugué HRP à 1:10 avec le tampon de dilution (pour un bâtonnet diagnostique : 100 µl de conjugué HRP + 900 µl de tampon de dilution) et bien mélanger.
10. Laver quatre fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
11. Transférer le conjugué de RP dilué avec la pipette sur la plaque (100 µl / microcupule).
12. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
13. Laver cinq fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
14. Ajouter le substrat de TMB (rose) à la plaque (100 µl / cupule).
15. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et *à l'abri de la lumière*.
16. Ajouter la solution d'arrêt (100 µl / microcupule) et bien mélanger jusqu'à ce que la couleur change

complètement (~15 secondes, 600-800 rpm; soit avec un agitateur orbital soit avec le lecteur EIA).

17. Mesurer les résultats dans les 10 minutes avec le lecteur EIA à 450 nm.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer les résultats comme suit : **R= (Échantillon$_A$ / Contrôle positif$_A$) x K**

R= résultat
Échantillon $_A$ = Absorbance médiane de l'échantillon
Contrôle positif $_A$ = Absorbance médiane du contrôle positif

K = valeur fonction du lot qui figure dans la fiche de données de contrôle comprise dans le kit. Utilisez cette valeur pour calculer les résultats finaux.

Le résultats final est obtenu comme suit : **NÉGATIF : R < 0,8**
ZONE GRISE : 0,8 ≤ R ≤ 1,0
POSITIF : R > 1,0

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un résultat **négatif** signifie que l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgM spécifiques du virus Dobrava ni au virus Hantaan. Cela indique que le patient ne présente pas une infection aiguë au virus Dobrava ou Hantaan. Dans l'éventualité où une infection aiguë au virus Dobrava ou Hantaan serait toujours soupçonnée, il faudra répéter l'analyse avec un nouvel échantillon prélevé quelques jours après le premier.

Lorsqu'un échantillon s'avère **positif**, il indique que le patient présente une infection aiguë par le virus Dobrava ou Hantaan. Un facteur de résistance ou d'autres infections virales n'entraînent pas un résultat positif de cette épreuve.

Un résultat situé dans la zone grise signifie que le patient pourrait présenter une infection aiguë et nécessite que de nouveaux tests soient effectués. Dans ce cas, suivre les consignes de votre organisation. Il faudra généralement faire un nouveau prélèvement après quelques jours et retester celui-ci. Si le résultat se trouve toujours dans la zone grise ou s'avère négatif, le patient ne présente pas d'infection aiguë au virus de Dobrava ou de Hantaan.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Vérifiez que l'absorbance médiane du contrôle négatif et positif réponde aux critères figurant sur la fiche de données de contrôle. Veuillez noter que les valeurs des contrôles positifs et négatifs peuvent varier de lot à lot.

La variation d'absorbance de chaque paire d'échantillon et de contrôle doit être inférieure à 10%. Si le contrôle positif est utilisé dans différentes positions sur la plaque, la variation d'absorbance doit être inférieure à 20 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité et spécificité :

La sensibilité de 99 % et la spécificité de 99 % ont été obtenues en analysant les échantillons sériques de 41 patients en comparaison à la méthode de référence (IFA et ELISA, Institut de microbiologie et d'immunologie de Ljubljana, Slovénie).

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMPOSANTS DU KIT

Composant	Code	Information	Consignes d'utilisation	Conservation & stabilité
Bâtonnets diagnostiques	114202t	Plaque de microtitration recouverte d'un revêtement d'IgM anti-humaines (spécifiques de la chaîne μ).	Lavez les bâtonnets avec le tampon de lavage juste avant utilisation.	Non ouvert, dans l'emballage en aluminium entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon pour dilution	114x02v5	Tampon tris. Précoloré (rose). 65 ml.	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, positif	114202v1	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, négatif	114x02v7	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon de lavage concentré	114x02v6	Tampon tris. 2 x 50 ml	Diluer à 1:10 avec de l'eau désionisée juste avant utilisation.	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Conjugué HRP	114202v2	Protéïne de la nucléocapside du virus Hantaan conjuguée à la peroxidase de raifort. 1,5 ml.	Diluer à 1:10 avec le tampon de dilution juste avant utilisation.	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Substrat TMB	114x02v3	3,3',5,5'-Tétraméthyl-benzidine. Précoloré (rose). 12 ml.	Prêt à l'emploi	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Solution d'arrêt	114x02v4	0,1 M d'acide sulfurique. 12 ml.	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.

LITTÉRATURE

Hujakka H., et al. 2003 Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: Specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. J. Virol. Methods 108(1):117-122.

Hujakka H., et al. rapid tests for detection of hantavirus IgM antibodies. Abstract in XIIth International Congress of Virology, Paris 27th July – 1st August, 2002.

Vapalahti O., et al. European Hantaviruses: Diagnostic aspects. Abstract in The Fifth International Conference on Hemorrahagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS), and Hantaviruses, 13-16 June 2001.

Klempa B., et al. 2004 First molecular identification of human Dobrava virus infection in central Europe. J Clin Microb 42(3): pp 1322-1325.

Sirola H. 2003. Serological rapid tests for detection of human and rodent hantavirus infections. Doctoral dissertation. Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 155. ISBN 951-781-253-1. ISSN 1235-0486.

Avšič-Županc T, Xiao S-Y, Stojanović R, Gligić A, van der Groen G, LeDuc JW. Characterization of Dobrava Virus: a Hantavirus from Slovenia. Journal of Medical Virology 1992; 38:132-7.

Elgh F., et al. Serological Diagnosis of Hantavirus Infections by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Detection of Immunoglobulin G and M Responses to Recombinant Nucleocapsid Proteins of Five Viral Serotypes. J Clin Microbiol 1997, 35(5): 1122-30.